

**POLYAMIINIEN VESILIUOSTEN ANALYSOINTI  
”ELEKTRONISTA NENÄÄ” KÄYTTÄEN: PH:N JA  
POLYAMIINIEN ASETYLAATION VAIKUTUS DETEKTIOON.**

Antti Tuokko ja Ilari Ryhänen  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen laitos  
Dosentti Oksalan Ryhmä  
Helmikuu 2013

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen laitos  
Dosentti Oksalan tutkimusryhmä

Antti Tuokko ja Ilari Ryhänen:

POLYAMIINIEN VESILIUOSTEN ANALYSOINTI ”ELEKTRONISTA NENÄÄ”  
KÄYTTÄEN: pH:N JA POLYAMIINIEN ASETYLAATION VAIKUTUS DETEKTIOON.

Kirjallinen työ, 24 sivua

Ohjaaja: Dosentti Niku Oksala

Helmikuu 2013

*Kaasuanalysaattori, syöpä, diagnostiikka, diagnostiset välineet*

Tämä syventävien opintojen kirjallinen työ on osa dosentti Oksalan johtamaa tutkimusta, jossa kehitetään ionimobilitaattispektrometriaan perustuvaa laitetta syöpädiagnostiikkaa varten. Tutkimme ChemPro 100 –laitteen kykyä erottaa vesiliuoksesta polyamiineja. Polyamiinit ovat solujen jakautumiseen ja energiankulutukseen assosioituvia molekyylejä, joiden pitoisuuksien on kirjallisuudessa todettu nousevan maligniteettien yhteydessä.

Tutkimuksen yhteydessä on jo aiemmin todettu, että ChemPro 100 kykenee tunnistamaan tutkittuja polyamiineja kaasufaasista. Lisäksi laitteella on tutkittu malignia munuaiskudosta ja erotettu syöpäsolulinjoja hyvänlaatuisista soluista.

Tässä osatyössä keskitymme mittausmenetelmän optimoimiseen polyamiiniliuosten erottelua varten. Selvitämme, miten pH:n nostaminen 7:stä 10:een vaikuttaa laitteen erotuskykyyn ja vertaamme asetyloimattomien ja asetyloitujen polyamiinien detektiota. Aiemmat tutkimustulokset ovat osoittaneet, että asetyloitujen polyamiinien pitoisuuksien muutokset ovat erityisen tunnusomaisia maligniteeteille.

pH:n nostamisen havaittiin parantavan selvästi laitteen erotuskykyä veteen nähden kaikkien mitattujen polyamiinien osalta. Asetylaatio ei itsessään parantanut erottelukykyä.

## SISÄLLYSLUETTELO

<b>1</b>	<b>1 JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
1.1	Polyamiinit .....	1
1.1.1	Polyamiinit.....	1
1.1.2	Polyamiinit, mitoosi ja apoptoosi .....	1
1.1.3	Polyamiinit ja syöpä.....	2
1.1.4	Polyamiinien metabolia .....	2
1.1.5	Polyamiinitutkimuksen historia.....	5
1.1.6	Polyamiinien kliininen potentiaali .....	5
1.2	Elektroniset nenät.....	6
1.2.1	Maligni kasvain voidaan havaita volatiileja aineita detektoimalla .....	7
1.2.2	Polyamiinien detektio elektronisella nenällä .....	9
1.3	Tutkimushypoteesit ja kemialliset perusteet niiden taustalla.....	10
<b>2</b>	<b>MENETELMÄT .....</b>	<b>11</b>
2.1	Välineet ja materiaali.....	11
2.2	Mittaaminen .....	12
2.3	Datan analysointi.....	13
<b>3</b>	<b>TULOKSET .....</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>POHDINTA.....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>LÄHDELUETTELO.....</b>	<b>19</b>

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Polyamiinit

### 1.1.1 Polyamiinit

Polyamiinit ovat kaikille eliöille yhteisiä orgaanisia molekyyliä, jotka tuotetaan aminohapoista. Ryhmän nimen mukaisesti molekyyleissä on kaksi tai useampia aminoryhmiä, jotka ovat osana suoraa hiiliketjua. Ihminen saa polyamiineja suoraan ravinnosta, kuten lihasta ja juustosta, mutta suuren osan myös oman aineenvaihduntansa tuotteena. Ureasyklissä tuotetaan ornitiinia, ja siitä edelleen soluissa suurempina pitoisuuksina esiintyviä putreskiinia, spermiidiä sekä spermiiniä. Soluista löytyy mitattavina pitoisuuksina myös kadaveriinia, jonka biosynteesi ei liity muihin polyamiineihin, mutta jonka voidaan rakenteensa perusteella tulkita kuuluvan ryhmään. (Gerner E.W. & Meyskens F.L. 2004)

### 1.1.2 Polyamiinit, mitoosi ja apoptoosi

Polyamiineilla on merkittävä osa solujen kasvun, energian käytön sekä jakautumisen säätelyssä. Molekyylien sisältämät aminoryhmät ovat fysiologisessa pH:ssa protonoituneina, joten polyamiinien kokonaisvaraus on voimakkaasti positiivinen. Tämän vuoksi polyamiinit sitoutuvat voimakkaasti solunsisäisen DNA:n, RNA:n sekä proteiinien happamiin, negatiivisesti varautuneisiin ryhmiin. Näin ne pääsevät vaikuttamaan suoraan nukleiinihapposynteesiin, geeniekspressioon sekä proteiinien toimintaan ja välillisesti myös ionikanavien toimintaan sekä ATP:n käyttöön. (Childs A.C. et al 2003)

Koska suurin osa polyamiineista on sitoutuneena solun makromolekyyliin, pienikin muutos solun kokonaispolyamiinipitoisuudessa aiheuttaa suuren suhteellisen muutoksen vapaiden polyamiinien konsentraatiossa. (Pegg A.E. 2009) Tämä polyamiinipitoisuuksien nousu onkin solun luonnollinen reaktio ympäröivistä kudoksista tuleviin proliferatiivisiin ärsykkeisiin.

Riittävän korkea polyamiinipitoisuus on välttämätön solun proteiini- sekä DNA-synteesin normaalille toiminnalle. Pitoisuuksien on havaittu olevan pienimpiä solusyklin G<sub>0</sub>-faasissa, jonka jälkeen ne nousevat ja saavuttavat huippunsa G<sub>1</sub>- sekä S-faasissa ja lähtevät jälleen laskuun. (Igarashi K. & Kashiwagi K. 2010) Polyamiinipitoisuuden voidaan siis katsoa säätelevän osaltaan solusykliä ja mitoosin käynnistymistä. (Bettuzzi et al 1999)

Polyamiinien suhde apoptoosiin on monimutkaisempi. Apoptoosin kemiallisesta tai fysikaalisesta syystä riippuen polyamiineja voidaan pitää joko suojaavina tai herkistävinä tekijöinä. Vaikutus vaihtelee myös solutyypeittäin. (Igarashi K. & Kashiwagi K. 2010) Erityisen mielenkiintoinen on havainto, jonka mukaan solun runsas polyamiinipitoisuus suojaisi tuumorinekroosifaktorin aiheuttamalta solukuolemalta, mahdollisesti myös maligniteetin yhteydessä. Varsinkin spermiinin suojaavan vaikutuksen uskotaan perustuvan sen DNA:ta ja kromatiinia stabiloivaan vaikutukseen. (Penning L.C. et al 1998, Tantini B. et al 2004)

### **1.1.3 Polyamiinit ja syöpä**

Polyamiinikonsentraatioiden yhteys kudoksen hyperplasiaan ja erityisesti maligniteetteihin on kliinisesti mielenkiintoinen ja ollut jo vuosikymmeniä kiivaan tutkimuksen kohteena.

Poikkeavasti jakautuvan kudoksen korkeaa polyamiinipitoisuutta voidaan pitää joko maligniteetin syynä tai seurauksena. Toisaalta epänormaalin korkea polyamiinipitoisuus solun jakautumissyklin loppuvaiheessa lisää epävakaiden mitoosien esiintyvyyttä ja siten mutaatoriskiä. Erityisesti apoptoosikykynsä menettäneissä syöpäsoluissa mitoosiaktiiviteetti kasvaa polyamiinipitoisuuden mukana. Toisaalta syöpäsoluissa onkogeenien luenta johtaa polyamiinien synteesinopeutta säätelevien entsyymien pitoisuuksien epätasapainoon. Tämän seurauksena polyamiinikonsentraatiot nousevat, mikä on omiaan voimistamaan syöpäkudoksen nopean kasvun noidankehää. (Casero R.A. & Marton L.J. 2007)

Yhdeksi selittäväksi tekijäksi on havaittu useissa syövässä muuntuva c-MYC-*proto-onkogeeni*, jolla on suora vaikutus varsinkin ODC:n tuotantoon. Samoin jos transkriptiotekijää koodaavat c-JUN tai c-FOS muuntuvat, entsyymipitoisuudet nousevat. Lisäksi on löydetty yksittäisiä pistemutaatioita, jotka vaikuttavat samalla tavalla. (Johnson L.R. & McCormack S.A. 1999)

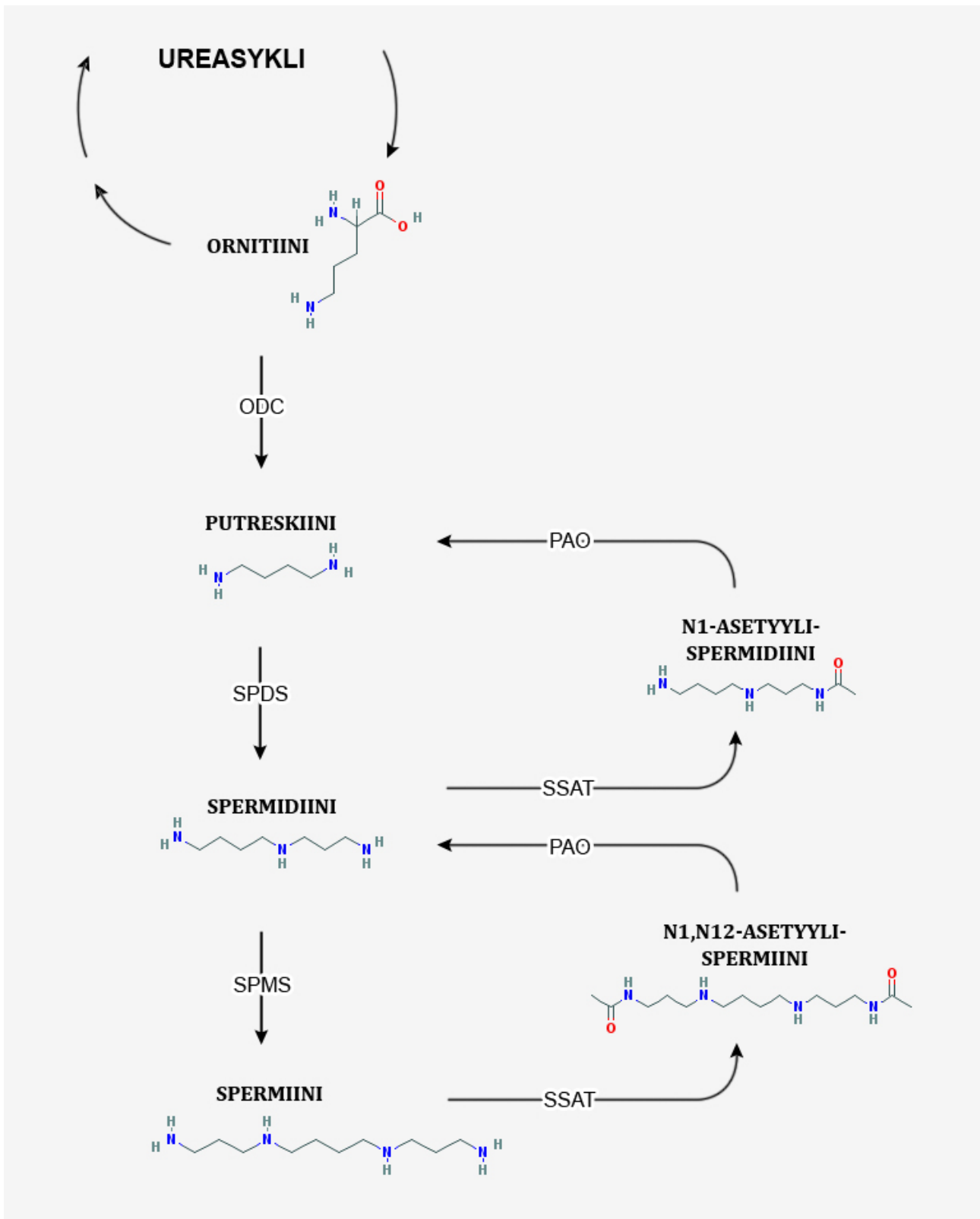
### **1.1.4 Polyamiinien metabolia**

Polyamiinit ovat lähtöisin ornitiinista, joka on yksi ureasyklin välituotteista. Ornitiinilla on kaksi vaihtoehtoista reaktiotietä, joista toinen johtaa ornitiinidekarboksylaasi-entsyymin (ODC) katalysoimana putreskiinin muodostumiseen (diamiini). Putreskiinista voidaan muodostaa aminopropyylitransferaasin avulla irreversiibelisti spermiidiiniä (triamiini) ja spermiidiniä edelleen spermiiniä (tetra-amiini). Osa ornitiinista reagoi karbamoyylifosfaatin kanssa muodostaen sitrulliinia, joka on ureasyklin välituote. (Gerner EW & Meyskens FL 2004)

Solun polyamiinipitoisuutta säädellään tarkasti moninkertaisen negatiivisen palautejärjestelmän avulla, koska sillä on useita suoria vaikutuksia solun käyttäytymiseen. Kun solussa on runsaasti polyamiineja, ne sitoutuvat suoraan DNA:han estämään ornitiinidekarboksylaasin (ODC) sekä ornitiinidekarboksylaasiantitsyymien (OAZ) transkriptiota. ODC:n vähentyessä polyamiinisynteesi hidastuu. OAZ pienentää solun polyamiinikuormaa vähentämällä soluunottoa ja synteesiä. (Igarashi K. & Kashiwagi K. 2010)

Solu voi reagoida polyamiinipitoisuuden nousuun myös lisäämällä eritystoimintaa, jota varten polyamiinit täytyy asetyloid. Asetylointi on tarpeen, koska poolisten asetyyliryhmien liittäminen tekee muuten hydrofobisista molekyyleistä hydrofiilisempia ja siten vähentää niiden erityksen jälkeistä imeytymistä takaisin solumembraanin läpi. Spermiidiini-spermiiniasetyylitransferaasi-entsyymi (SSAT) voi liittää asetyyliryhmän spermiidiiniin ketjun ensimmäiseen hiileen (N1), spermiiniin ensimmäiseen sekä viimeiseen hiileen (N1,N12) tai kumpaan tahansa putreskiinin kahdesta hiilestä. (Casero R.A. & Pegg A.E. 1993)

Asetylaatioreaktioiden myötä syntyy N1-asetyyლისpermiiniä, N1-asetyyლისpermiiniä, N1,N12-diasetyylispermiiniä sekä asetyyliputreskiinia. Nämä molekyylit eroavat asetyloimattomista polyamiineista sekä kemialliselta luonteeltaan, että biologiselta rooliltaan. Asetylointi on eritystoiminnan lisäksi solujen ainut keino siirtää muuten irreversiibelin synteesireaktion tasapainoa lähtöaineisiin pain. Myös molekyylien affiniteetti nukleiinihappoja sekä proteiineja kohtaan sekä samalla vaikutus solun toimintaan muuttuu. Asetyloimattoman polyamiinikonsentraation noustessa OAZ myös lisää asetylaatiosta vastaavan SSAT-entsyymien aktiivisuutta. (Casero R.A. & Pegg A.E. 1993)



Kuva 1. Polyamiinimetabolia. Lyhenteet: ODC = ornitiinidekarboksylaasi, SPDS = spermidiniisyntaasi, SPMS = spermiinisyntaasi, PAO = polyamiinioksideasi, SSAT = spermidini/spermiiniasetyylitransferaasi

### **1.1.5 Polyamiinitutkimuksen historia**

Tiedeyhteisön kiinnostus polyamiineihin alkoi 60-luvun lopulla, kun rotan maksan regeneraation sekä joidenkin syöpätyyppien yhteydessä todettiin kohonneita polyamiinipitoisuuksia. (Russell D.H. & Snyder S.H. 1968) Pian pitoisuuksien havaittiin olevan koholla myös syöpäpotilaiden virtsassa (Russell D.H. et al 1971)

70-luvulla esitettiin ensimmäisiä ajatuksia polyamiinien käytöstä diagnostisena välineenä. Saman tutkimusryhmän havaintojen perusteella erityisesti asetyloitujen polyamiinien pitoisuus on syöpäpotilailla kohonnut ja mitattavissa myös virtsasta. Myöhemmin todettiin polyamiinipitoisuuksien nousevan yleisesti hyperplastisissa ja neoplastisissa kudoksissa, kuten prostatahyperplasiassa (Dunzendorfer U. & Russell D.H. 1978)

Asetyloitujen polyamiinien konsentraatioiden nähtiin useissa syövässä nousevan erityisen voimakkaasti. 80-luvun keskivaiheilla käsitys asetyloitujen polyamiinien kliinisestä käyttökelpoisuudesta edelleen vahvistui, kun lymfoomapotilaiden virtsasta analysoitiin kaasukromatografian avulla vapaiden polyamiinien lisäksi myös tärkeimpiä fysiologisia asetyloituja muotoja. (van den Berg et al 1986)

Myöhemmissä tutkimuksissa on osoitettu, että eri syöpätyypeille ei ole olemassa yhteistä polyamiiniprofiilia, vaan sekä tuotanto että erityyppiset vaihtelevat. Erityisesti rintasyövän yhteydessä tuumoriin liittyviä volatiilisia molekyylejä on etsitty virtsan lisäksi myös potilaiden uloshengitysilmaasta. (Matsumura K. et al 2010)

### **1.1.6 Polyamiinien kliininen potentiaali**

Jo polyamiinitutkimuksen alkua ajoista lähtien on havaittu, että polyamiinipitoisuudet muuttuvat merkittävästi myös hoidon seurauksena. Mikäli kasvain onnistutaan poistamaan kirurgisesti kokonaan, potilaan virtsan polyamiinipitoisuudet laskevat normaalitasolle. Sytostaattihoitoon eri tyyppiset kasvaimet reagoivat eri tavoin. Joissakin tapauksissa polyamiinieritys alkaa välittömästi laskea ja esimerkiksi joissakin leukemiatapauksissa hoidon alussa havaitaan paradoksaalista polyamiinipitoisuuksien nousua, kunnes ne hoidon tehotessa kääntyvät laskuun. (Russell D.H. et al 1971) (Byun J.A. et al 2009)

Näihin havaintoihin perustuen voidaan polyamiinimittauksilla todeta olevan sekä diagnostista, että prognostista arvoa hoidon tehoa arvioitaessa.



## 1.2 Elektroniset nenät

Elektronisista nenistä puhuttaessa tarkoitetaan useilla eri toimintaperiaatteilla toimivia teknisiä sovelluksia, joilla pyritään havaitsemaan ilmassa olevia volatiilisia (haihtuvia) molekyylejä. Biologisen nenän tapaan havainnointi on lähinnä laadullista kaasumaisien aineiden erottamista toisistaan. Terminä ”elektroninen nenä” voi olla harhaanjohtava. Biologisen nenän pitkälle erikoistunut adaptaatio palvelee nisäkkään päivittäiselle elämälle tärkeitä tarkoituksia kuten ruuan, sen laadun tai muiden eläinten aistimista. Toisin sanoen merkityksettömät taustaelementit kuten esimerkiksi ympäristön ilmankosteus ei vaikuta aistimukseen, sillä reseptoreita vesihöyrylle ei ole; tämä olisi irrelevanttia informaatiota, sillä sitä löytyy kaikkialta ympäröivässä ilmakehässä. Toisaalta kaasumaisten aineiden detektioon suunnitellut tekniset sovellukset eivät ensikädessä tätä erotusta tee. Haasteelliseksi keinotekoisien haistamisen tekeekin juuri olennaisen ja halutun tiedon saaminen runsaasti erilaisia komponentteja sisältävästä kaasuseoksesta. Tärkeitä kehityksen osa-alueita sensoriikan lisäksi ovatkin analysoitavan näytteen esikäsittely ja standardointi sekä raakainformaation jälkikäsittely hajuaistiin liittyviä hermoverkkoja imitoiden. Jälkimmäisten avulla sensoreiden dataa voidaan vahvistaa ja käsitellä halutun komponentin osalta erotuskyvyn parantamiseksi (Röck et al. 2007; Turner et al. 2004).

Kaikkeä elektroniseen haistamiseen kehitettyä tekniikkaa luonnehtii yksi yhdistävä piirre: Ne mittaavat aineen ominaisuuksia, jotka analysoidaan kiinteällä algoritmilla. Kuten ihmisnenä, elektroninen vastine muodostaa hajusta profiilin, ”hajujäljen”, jota analysoidaan, verrataan aiemmin varastoituihin profiileihin ja tunnistetaan. Analyysin perusteella näytteitä vertaillaan tähtäämättä aineen yhdisteiden tarkkaan identifiointiin tai konsentraation määrittämiseen. Kuten ihmisen hajuasitin kohdalla, tuloksen tulee sisältää kohteen tunnistus (esim. omena vai appelsini?), todentaa variaatioita (vertailla joukkoa) tai antaa ennustearvo näytteiden erojen perusteella (esim. näytteen pilaantumiseen korreloivan hajun intensiteetti) (Röck et al. 2007).

Keinotekoisien haistamisen kehitys alkoi Moncrieffin julkisuuteen tuomasta ensimmäisestä kemiallisiin kaasusensoreihin perustuvasta instrumentista vuonna 1961. Tätä seurasi kaasusensoriikkaan keskittyviä tutkimuksia, joissa pyrittiin käyttämään hyväksi muun muassa hajuaineiden elektrodilla tapahtuvia hapetuspelkistysreaktioita sekä hajuaineiden sähköjohtavuutta (Pavlou et al. 2000). Tutkimusten tuloksena vuonna 1982 Persaudin ja Doddin antoivat keinotekoiseen haistamiseen tarkoitettulle teknologialle nykyisen suuntansa. Heidän ajatuksenaan oli ihmisen hajuaistijärjestelmän simuloiminen sen eri vaiheissa, mukaan lukien näytteiden käsittely ja

suodattaminen, biokemiallinen sensoriikka, jonka kanssa volatiiliset komponentit voivat reagoida sekä sensoriiikan tuottaman datan jälkikäsitteily neuraalista konvergenssia mukaillen: syntyi ensimmäinen varsinainen ”elektroninen nenä” (Persaud et al. 1982).

Persaud’n ja Doddin innovaation jälkeen sensoriteknologian ja dataa käsittelevän keinoälyn nopea kehitys on mahdollistanut useiden erilaisten tekniikoiden kehittämisen. Viime vuosina vanhaa sensoriteknologiaa ei olekaan vain paranneltu vaan täydennetty alalle tulleeella, uudella teknologialla. Eri periaatteilla toimivat sensorit ovat selektiivisiä erilaisille aineityypeille, mikä tarjoaa laajemmat mahdollisuudet haluttujen ominaisuuksien havaitsemiseen. 90-luvun alussa markkinoille tulivat ensimmäiset kaupalliset sovellukset ja laitteille alettiin etsiä käyttökohteita erityisesti ruuan laadunvalvonnassa, sekä lääketieteellisessä tutkimuksessa (Röck et al. 2007; Turner et al. 2004).

### **1.2.1 Maligni kasvain voidaan havaita volatiileja aineita detektoimalla**

Ajatus syövälle ominaisesta hajuprofiilista sai alkunsa vuonna 1989 The Lancetissa julkaistusta tapauksertomuksesta, jossa potilas hakeutui terveydenhuollon piiriin lemmikkikoiran osoitettua toistuvasti erityistä mielenkiintoa haistelemalla lopulta maligniksi melanoomaksi osoittautunutta iholeesiota (Williams et al. 1989). Vuonna 2001 niinikään samassa lehdessä julkaistiin toinen tapauksertomus, jossa raportoitiin potilaan labradorinnoutajan osoittaneen voimakasta mielenkiintoa myöhemmin basaliomakarsinoomaksi diagnosoitua ihomuutosta kohtaan. Kiinnostus lakkasi leesio poistamisen myötä (Church et al. 2001).

Anekdotaalisten tapauselostusten tueksi saatiin pian kokeellista näyttöä. Tutkimusasetelmissa koiria koulutettiin järjestelmällisesti erottamaan maligneja näytteitä terveistä verrokeista. Vuonna 2004 julkaistussa tutkimuksessa koulutetut koirat tunnistivat malignia rakkosyöpää sarastavien potilaiden virtsanäytteet verrokeista 41% onnistumisprosentilla, mikä oli merkittävä tulos puhtaan sattuman laskennalliseen odotusarvoon (14%) nähden (Willis et al. 2004). Vuonna 2006 McCulloch ryhmineen ylsi jopa 88-99% sensitiivisyyteen ja spesifisyyteen koirakokeissa erotettaessa rinta- ja keuhkosyöpäpotilaiden hengitysnäytteitä terveiden vastaavista (McCulloch et al. 2006). Tuloksia tukee edelleen myös 2010 julkistettu kontrolloitu kaksoissokkoutettu tutkimus, jossa belgianpaimenkoira koulutettiin haistamaan prostatasyöpä virtsanäytteestä. Koira erotti syövä t verrokeista 91%:n sensitiivisyydellä ja spesifisyydellä (Cornu et al. 2010). Vaikka tutkimustulokset

ovat lupaavia, koirien käyttö diagnostisena menetelmänä laajemmassa mittakaavassa on tuskin käytännössä mahdollista sairaalaympäristöön soveltumattomuuden vuoksi.

Sekoittavien tekijöiden kattava hallinta on potilastapauksien kohdalla haasteellista, mikä on aiheuttanut myös kritiikkiä koirakokeita kohtaan: esimerkiksi syöväälle altistavat elintavat voisivat aiheuttaa erotettavan ominaisuutuksun, jolloin ”syövä haju” olisi lähinnä assosiativinen löydös eikä varsinaisesti kasvainkudoksen aiheuttama (Leahy. 2004). Vuonna 2010 Matsumura ryhmineen pyrki äärimmäisen tarkkaan, kontrolloituun tutkimusasetelmaan, jossa käytettiin geneettisesti identtisiä laboratoriohiiriä. Perifeeristen tuumorien istutukseen käytettiin kahta erilaista syöpäsolulinjaa, jotka muistuttavat ihmisen keuhkoadenokarsinoomaa morfologian, histopatologian sekä molekylaaristen ominaisuuksien osalta. Kumpaakin syöpäryhmää vastaan muodostettiin kontrolliryhmä injisoimalla samasta kannasta peräisin oleviin yksilöihin suolaliuosta. Kaksi ryhmää valjastettiin sensoriryhmiksi jompaakumpaa syöpävirtsaa kohtaan harjoittamalla hiiriä syöpävirtsan haistamisessa Y-labyrintissa. Myös virtsan volatiilien komponenttien tarkempi profilointi tehtiin SPME (solid-phase-microextraction)- sekä GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry)-menetelmiä hyväksi käyttäen. Merkille pantavaa oli, että sensoriryhmät tunnistivat syöpävirtsat myös ristiin toisen syöpätyypin ryhmistä ilman erillistä koulutusta. Virtsan koostumusta analysoidessa massaspektrometrilla ja kaasukromatografilla näytteille saatiin kuitenkin merkittävästi erilaiset spektrit (Matsumura et al. 2010). Tämä voisi antaa aihetta olettaa, että näillä kasvaimilla on jokin yhteinen vielä määrittämätön merkittävä komponentti, joka aiheuttaa hiirille hajuaistimuksen.

Kaiken kaikkiaan tulokset tukevat oletusta, että aktiivinen syöpätauti aiheuttaa tunnistettavissa olevan hajun määrättyissä näytteissä tautitilalle ominaisen haihtuvien komponenttien profiilin mukaan. Tiettyjen volatiilien komponenttien, kuten bentsaldehydin ja vanilliinin, yhteyttä erilaisiin mikrobikasvustoihin on kuvattu 1800-luvulta lähtien (Pavlou et al. 2000). Päähuomio lääketieteen sovelluksissa onkin keskittynyt bakteeri- ja sieni-infektioiden havaitsemiseen ja erottamiseen, joissa elektronista nenää käyttäen tulokset voidaan parhaassa tapauksessa saada minuuteissa (Turner et al. 2004). Elektronisia neniä koskevissa katsauksissa syöpädiagnostiikka on kuitenkin alkanut saada huomiota enenevissä määrin (Röck et al. 2007; Turner et al. 2004; Pavlou et al. 2000). Viime vuosina aihetta käsitteleviä tutkimustuloksia on julkaistu kiihtyneeseen tahtiin.

Eniten syöpädiagnostiikkaa koskevaa tutkimustietoa on kertynyt keuhkosityövästä, missä elektroninen nenä on käytetty tutkittavien uloshengitysilman analysoimiseen. Strategiat syövän havaitsemiseksi poikkeavat toisistaan tutkimusten välillä. Toisaalta on tehty pohjatyötä potentiaalisten, kasvainaktiivisuuteen viittaavien metaboliittien tuntemiseksi ja käytetty dataa havaintolaitteiston kokoonpanon muodostamista varten (Phillips et al. 2003), toisaalta on käytetty ns. ”musta laatikko”-lähestymistapaa, jossa keuhkosityöpötilaiden ja terveiden verrokkien näytteiden hajuprofiileja on tallennettu ja raakadataa käsittelemällä luotu algoritmi profiilien jaottelemiseksi (Dragonieri et al. 2009; Machado et al. 2005). Tällöin menetelmä on validoitu mittaamalla sokkoutetusti elektronisen nenän harjoitusvaiheessa poissaolleiden syöpäsairaiden ja verrokkien osajoukkoja. Tutkimustulokset ovat olleet lupaavia, syöpötilaan ja terveen verrokin erottelussa on päästy pääsääntöisesti päästy 80-90% herkkyys- ja 90-100% tarkkuusluokkaan. Keuhkosityöpää on myös onnistuneesti erotettu muista kroonisista keuhkosairauksista (Dragonieri et al. 2009; D'Amico et al. 2010). Syövän operatiiviseen hoitoon ohjattuja ja kirurgisen operaation läpikäyneitä keuhkosityöpötilaita tutkittaessa elektroninen nenä erotteli leikkaamattomat leikatuista sekä terveistä verrokeista (Di Natale et al. 2003). Tulosten perusteella on herätelty toiveita elektronisen nenän käyttämisestä sekä syöpäseulonnessa että hoidettujen seurannassa tulevaisuudessa.

Tutkimuskokonaisuutemme toisena osatyönä on jo tutkittu elektronisen nenän käyttöä malignien ja ei-malignien eturauhassolujen erottamiseksi in vitro. Tästä saatiin lupaavia tuloksia, sillä menetelmä tunnisti oikein 96,4 – 97,1% näytteistä, solulinjasta riippuen (Roine et al. 2012).

### **1.2.2 Polyamiinien detektio elektronisella nenällä**

Polyamiinitasojen on osoitettu aiemmin osoitettu merkittävästi nousevan syöpötilaan virtsassa (Russell et al. 1971). Asetyloidun polyamiinin, N1,N12-diasetyylispermiinin, pitoisuus terveisiin verrokeihin nähden on herättänyt erityistä mielenkiintoa, sillä terveillä polyamiinin pitoisuus virtsassa on täysin mittaamattomissa syöpötilaiden merkittävistä polyamiinitasoista poiketen (van den Berg et al. 1986). Tämän pohjalta onkin kehitetty kaupallinen, diasetyylispermiini-spesifinen vasta-ainekitti (ELISA), jolla polyamiinipitoisuuksia voi yksinkertaisella tavalla mitata potilailta, joilla on normaali munuaisfunktio (Hiramatsu et al. 1998). Testillä on saatu lupaavia tuloksia haima- (Yamaguchi et al. 2005), maksa- (Enjoji et al. 2004), sekä rinta- ja kolonsyövän (Hiramatsu et al. 2005) diagnostiikassa.

Dosentti Oksalan tutkimusryhmän aikaisempien töiden perusteella ChemPro 100-kaasuanalysaattori kykenee havaitsemaan tutkitut polyamiinit 0,1-0,001 molaarisista vesiliuoksista. Mikromolaariseen erottelukykyyyn ei olla päästy, jolloin teoriassa terveiden ihmisten polyamiinit eivät ole laitteella havaittavissa (Inoue et al. 2005) mutta aiempien tutkimusten valossa syöpää sairastavien polyamiinipitoisuudet ovat laskennallisesti detektoitavalla tasolla (Russell et al. 1971, Dunzendorfer et al. 1978).

### 1.3 Tutkimushypoteesit ja kemialliset perusteet niiden taustalla

Koejärjestelymme on osa tutkimuslinjaa, jonka tavoitteena on optimoida elektronisen nenän polyamiinidetektiota. Herkkyyttä voidaan yrittää parantaa muuttamalla laitteiston rakennetta, mitattavien näytteiden koostumusta, mittaolosuhteita tai mittaustulosten analysointimenetelmiä. Nyt keskityimme lähinnä näytteiden koostumukseen ja osittain analysointimenetelmän parempaan ymmärtämiseen. Vertasimme keskenään asetyloimattomien ja asetyloitujen polyamiinien detektiota elektronisella nenällä. Näiden jokaisen kohdalla selvitimme myös näytteen happamuuden vaikutusta herkkyyteen pH-arvoilla 7 ja 10.

Ensimmäisen hypoteesimme mukaan asetylaatio lisää polyamiinien volatiilisuutta. Tämä perustuu oletukseen, että polyamiinien asetylaatio vähentää vetysidoksia vesimolekyylien kanssa ja sen myötä hydrofiilisyyttä. Fysiologisessa pH:ssa amiini on emäsmuodossa, eli sillä on vapaa elektronipari, jolla se sitoo vesimolekyylin vetyatomia. Voimakkain vetysidos syntyy, kun vety on peräisin hapelta ( $H_2O$ ,  $R-OH$ ) ja elektronipari polyamiinin tapaan tyveltä. Tällöin sidosenergia on noin 29 kJ/mol.

Asetyyyliryhmän liittyessä polyamiinimolekyyliin, muuttuu aminoryhmä amidiryhmäksi. Tämä voi tapahtua spermidiinimolekyylin 1-positiossa tai spermiinimolekyylin 1-positiossa tai sekä 1-, että 12-positioissa olevien typpiatomien kohdalla. Tämän additioreaktion yhteydessä typpiatonin vapaa elektronipari siirtyy karbonyyliryhmän hapelle, jolloin syntyy kahtaisioni  $+N=C-O-$ . Karbonyyliryhmän happi voi edelleen muodostaa vetysidoksia vesimolekyylien kanssa, jolloin sidosenergiaksi muodostuu pienempi n. 21 kJ/mol.

Lisäksi polyamiinimolekyylit muodostavat useita dipoli-dipoli -sidoksia ympäröivien liuotinmolekyylien kanssa. Solvatoitumisen myötä polyamiinin ympärille kuitenkin muodostuu noin kolmen molekyylikerroksen paksuinen kehä liuotinmolekyylejä, tässä tapauksessa vettä. Voimakkuudeltaan dipoli-dipoli -sidokset ovat alle 10 kJ/mol ja järjestymisen myötä suurelta osin kumoavat toisensa. Tämän vuoksi polyamiinimolekyylin hydrofiilisyyden lopulta riippuu

enimmäkseen sen muodostamien vetysidosten lukumäärästä sekä voimakkuudesta. Asetyloidut polyamiinit ovat siis teoriassa paremmin haihtuvia ja potentiaalisesti otollisia markkereita.

Toisen hypoteesimme mukaan pH:n nostaminen parantaa polyamiinien volatiilisuutta. Tämä perustuu osittain samaan mekanismiin kuin asetylaationkin vaikutus. Fysiologisessa pH:ssa 7 polyamiinimolekyylien aminoryhmät ovat varauksensa mukaisesti alttiita muodostamaan edellä mainittuja, haihtumista estäviä vetysidoksia ympäröiviin vesimolekyyliin. Kun pH:ta nostetaan, protonoituvat aminoryhmät eikä niillä ole enää ylimääräistä elektroniparia. Tämä vähentää koko polyamiinimolekyylin hydrofiilisyyttä ja saattaa parantaa sen kulkeutumista elektronisen nenän sensoreihin.

Näistä keinoista huolimatta polyamiinit ovat hyvin hydrofiilisiä yhdisteitä. Haihtumisprosessin lisäksi tämä voi hankaloittaa myös detektiota liian suuren ilman kosteuden yhteydessä. (Cohen 1998)

## 2 MENETELMÄT

### 2.1 Välineet ja materiaali

ChemPro 100:n toiminta perustuu IMS-tekniikkaan (Ion mobility sensor). IMS-tekniikka erottelee molekyylit niiden massan, varauksen ja liikkuvuuden mukaan.

IMS-laitteistossa molekyylit ionisoidaan radioaktiivisen beetasäteilijän, kuten  $^{63}\text{Ni}$  tai  $^{241}\text{Am}$  avulla. Tämän jälkeen ionit ohjataan virtausputkeen, jossa ne kiihdytetään heikon sähkökentän avulla kohti detektoria. Ioninen kulkua hidastaa törmäily ympäröivän ilman molekyylien kanssa, jolloin suuremmat ionit törmäilevät pienempiä voimakkaammin. Tämä mahdollistaa ionien erittelyn muodon ja koon mukaan. Laitteen elektrodit reagoivat molekyyliin niiden varauksen mukaan. Näiden muuttujien avulla voidaan arvioida partikkelin luonnetta, mm. muotoa, kokoa, konsentraatiota, sekä varausta. (Röck et al. 2008)

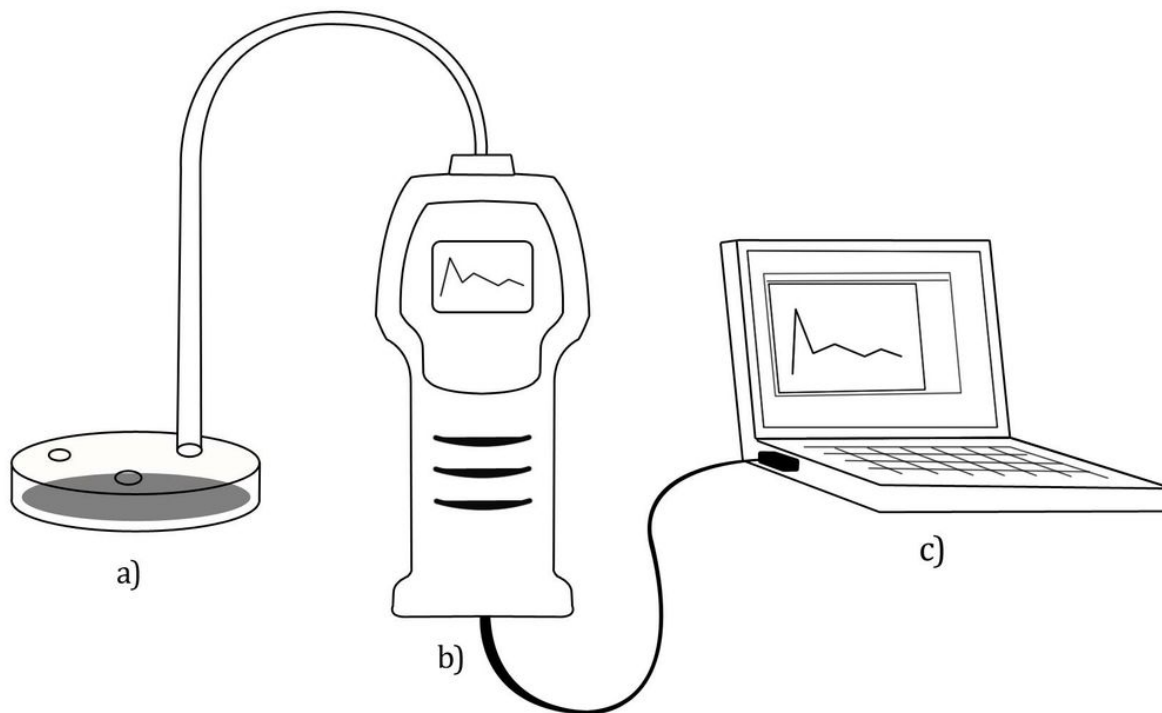
Mittauksissamme käytetyt polyamiinit olivat peräisin kahdelta toimittajalta. Asetyloimattomina polyamiineina käytettiin Sigma-Aldrich -yhtiön valmisteita ja asetylidut polyamiinit syntetisoitiin yhteistyökumppaneidemme laboratoriossa Kuopion yliopistossa. Kaikkiaan tutkittaviin molekyyliin kuuluivat putreskiini, spermidiini, spermiini, N1-asetyyლისpermidiini, N1-

asetyyლისპერმიინი ja N1,N12-diasetyyliinormospermiini. Näistä jokaisesta valmistettiin steriiliin veteen konsentraatioltaan 1 mmol/l liuos. Lisäksi spermidiinistä, spermiinistä sekä asetyloiduista muodoista valmistettiin toiset liuokset, joiden pH nostettiin NaOH:a käyttäen tasolle 10. Lisäksi myös steriilistä vedestä tehtiin mitattavat näytteet sekä pH:ssa 7 että 10, jotta voitiin hallita liuottimen ominaisuuksien muuttuminen sekoittavana tekijänä. Näin saatiin yhteensä 13 liuosta, joista jokaisesta mitattiin tulosten toistettavuuden varmistamiseksi kuusi näytettä.

## 2.2 Mittaaminen

Jokaista mittausta varten pipetoitiin 5ml näytettä uudelle, tehdaspuhtaalle petrimeljalle. Petrimalja peitettiin tämän jälkeen parafilmikalvolla, jonka läpi asetettiin kaksi 18G injektioneulaa sisäläpimitaltaan 0,9mm sekä 16G laskimokanyyli sisäläpimitaltaan 1,25mm. Injektioneulat toimivat ilman sisäänvirtausreitteinä ja näytekammioista virtaus jatkui edelleen kanyylin kautta mittalaitteelle. Näin kammion sisälle saatiin muodostumaan pyörteinen ilmavirtaus jonka mukana sensoreille kulkeutui näytteestä mahdollisimman runsaasti volatiilisia yhdisteitä. Mittauslaite kytkettiin datakaapelilla kannettavaan tietokoneeseen, johon oli asennettu Environicsin tarjoama datankeruuohjelmisto. ChemPro 100 rekisteröi tiedon sensorien tilasta sekunnin välein ja tätä 16-kanavaista dataa kerättiin jatkuvasti jokaisen näytteen mittauksen ajan.

Näytteet asetettiin 37-asteiseen vesihauteeseen 10 minuuttia ennen mittauksen aloitusta. Vesihaude sekä ChemPro 100 -laitteisto pidettiin vetokaapissa, joten lämpötila ja ilmavirtaus pysyivät vakioina. Mittauslaitteiston ilmoittama imuilman kosteus- sekä lämpötilatieto kirjattiin muistiin ennen ja jälkeen mittaustapahtuman. Näin voitiin kontrolloida mittausolosuhteiden tasaisuutta näiden muuttujien osalta. Kutakin näytettä mitattiin 15 minuutin ajan. Jokaisen näytteen jälkeen mittarin suodatin ja putkisto kuivattiin, jottei niihin tiivistynyt vesi aiheuttanut virhettä seuraaviin mittauksiin. Näytteiden välillä huoneilman annettiin virrata mittarin läpi 10 minuutin ajan mahdollisten sensoreihin jääneiden residuaalien poistumiseksi.



Kuva 2 Mittauslaitteisto: a) Vesihauteeseen sijoitettu pertimalja, jossa aukot korvausilmaa varten. b) ChemPro 100 -laite. c) Tietokone, jossa asennettuna datankeruuohjelmisto.

## 2.3 Datan analysointi

Tietokoneohjelmiston keräämä mittaustadata kerättiin matriisiksi, josta eroteltiin jatkoanalyysiä varten kunkin mittauksen signaalimaksimit. Data analysoitiin multi-dimensional scaling -menetelmällä, jolla 16-ulotteinen mittaustadata saatiin redusoitua 2-ulotteiseen avaruuteen pisteparvikuvajiksi. Dimensioreduktion toteuttamisessa hyödynnettiin Sammon Mapping (MDS)-sekä Primary Component Analysis (PCA) –menetelmiä.

## 3 TULOKSET

Tilastollinen analyysi tehtiin neljässä osassa. Asetyloimattomia ja asetuloituja polyamiineja verrattiin kumpaakin omina ryhmään vesinäytteisiin sekä pH:ssa 7 että pH:ssa 10.

Kunkin ryhmän osalta suoritettiin dimensioreduktio MDS:n ja PCA:n avulla. Näiden avulla muutettiin 16-ulotteinen data esitettäväksi 2-ulotteisena pisteparvikuviona, jonka pohjalta muodostettiin kunkin molekyylin erottamiseksi lineaarinen erotusfunktio. Funktioiden erottelukykyä mitattiin Leave-One-Out –ristivalidoinnin avulla.

Tulokset saatettiin konfuusiomatriisiin muotoon (esimerkki 1).



		Predicted MDS				Predicted PCA			
		Vesi pH 7	AcSpermiidiini	AcSpermiini	DiAcNorSpermine	Vesi pH 7	AcSpermiidiini	AcSpermiini	DiAcNorSpermine
Real	Vesi pH 7	36	0	1	0	36	0	1	0
	AcSpermiidiini	2	5	0	0	2	4	0	0
	AcSpermiini	6	0	1	0	6	0	1	0
	DiAcNorSpermine	1	0	1	5	1	0	0	5

### Esimerkki 1

Kunkin molekyylin osalta määritettiin erottelukyky veden suhteen, jotta pH:n muutoksen vaikutusta voidaan arvioida (taulukko 1). Taulukosta ilmenee kuinka usein laite erotti polyamiinimolekyylin onnistuneesti vedestä.

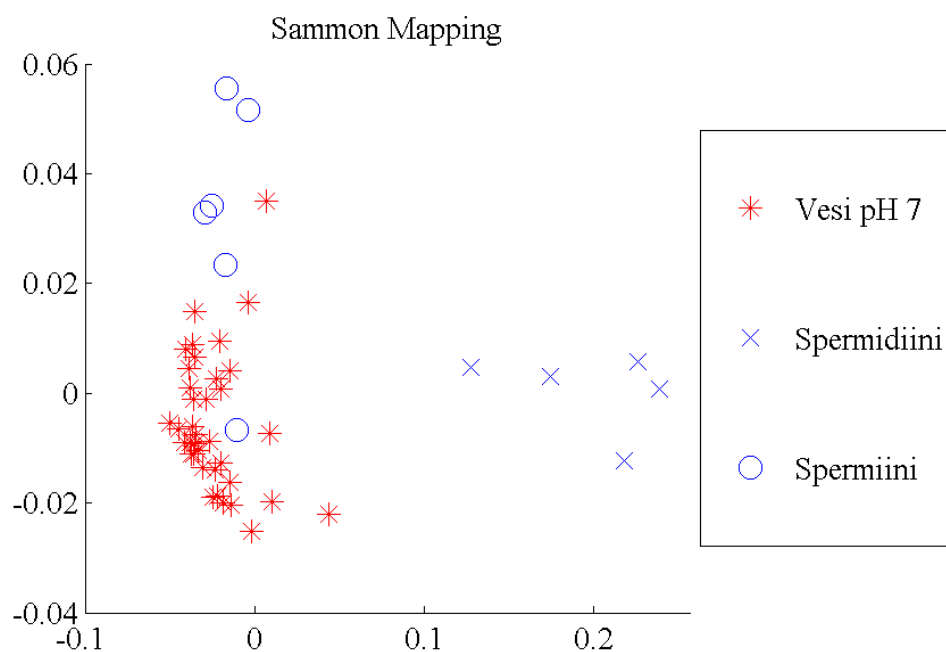
pH7		
	MDS	PCA
Spermiidiini	100.0%	100.0%
Spermiini	83.3%	83.3%
AcSpermiidiini	71.4%	66.7%
AcSpermiini	14.3%	14.3%
DiAcNorSpermiini	85.7%	83.3%

pH10		
	MDS	PCA
Spermiidiini	100.0%	100.0%
Spermiini	100.0%	100.0%
AcSpermiidiini	100.0%	100.0%
AcSpermiini	100.0%	100.0%
DiAcNorSpermiini	100.0%	100.0%

Taulukko 1

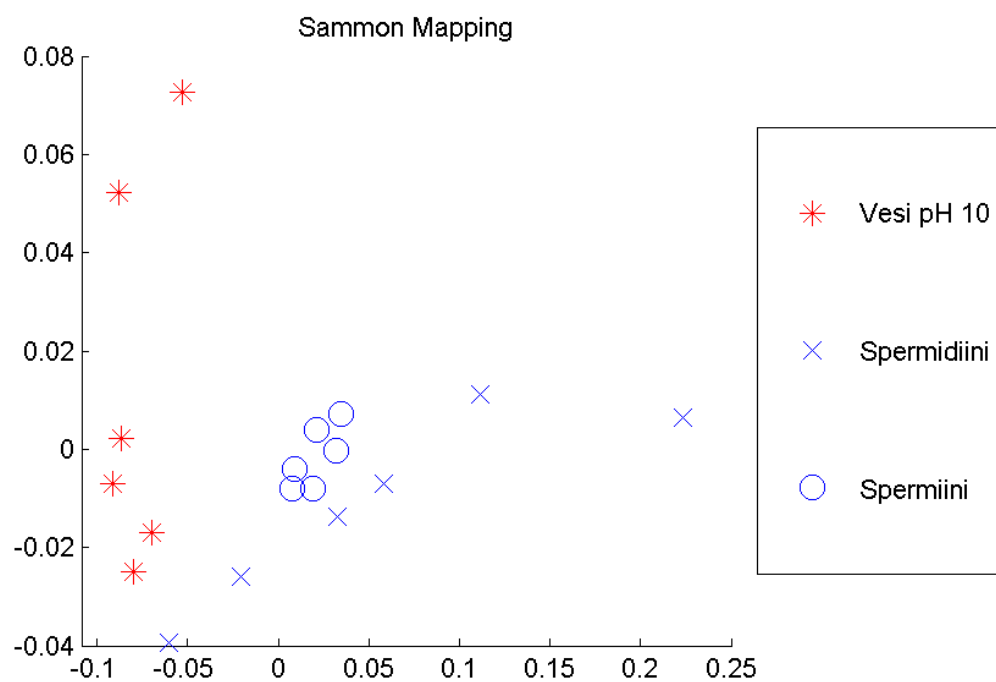
Alla olevat pisteparvikuviot havainnollistavat pH:n muutoksen positiivisen vaikutuksen menetelmän erottelukykyyneen.

### pH7

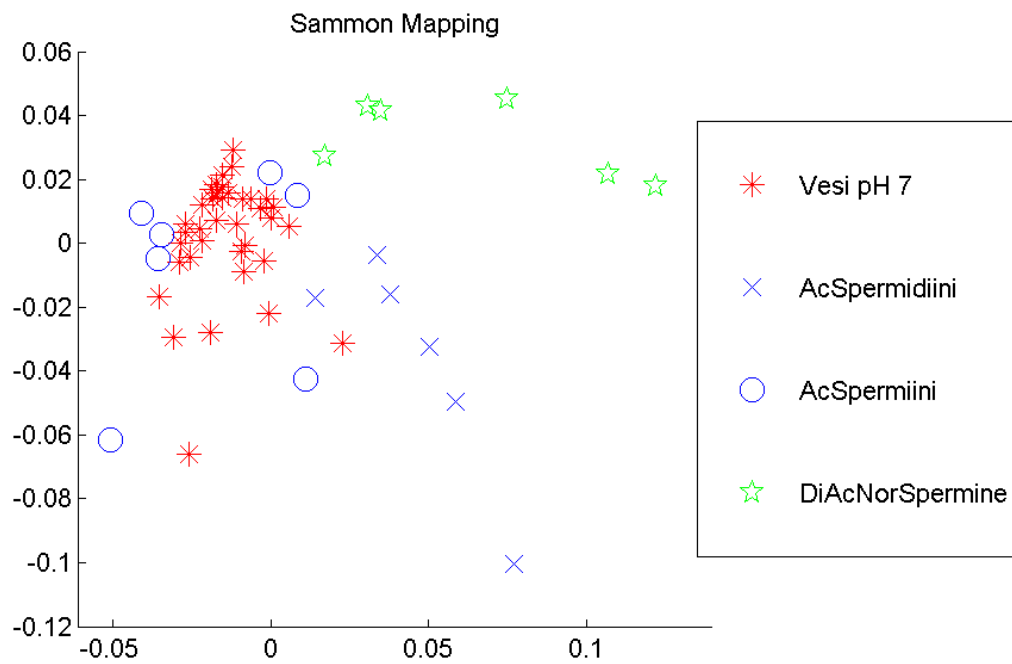


Kuvaaja 1 pH:ssa 7 spermiidiini erottuu hyvin omaksi pisteparvekseen. Spermiinin ja veden mittaustulosten välillä on merkittävää päällekkäisyyttä.

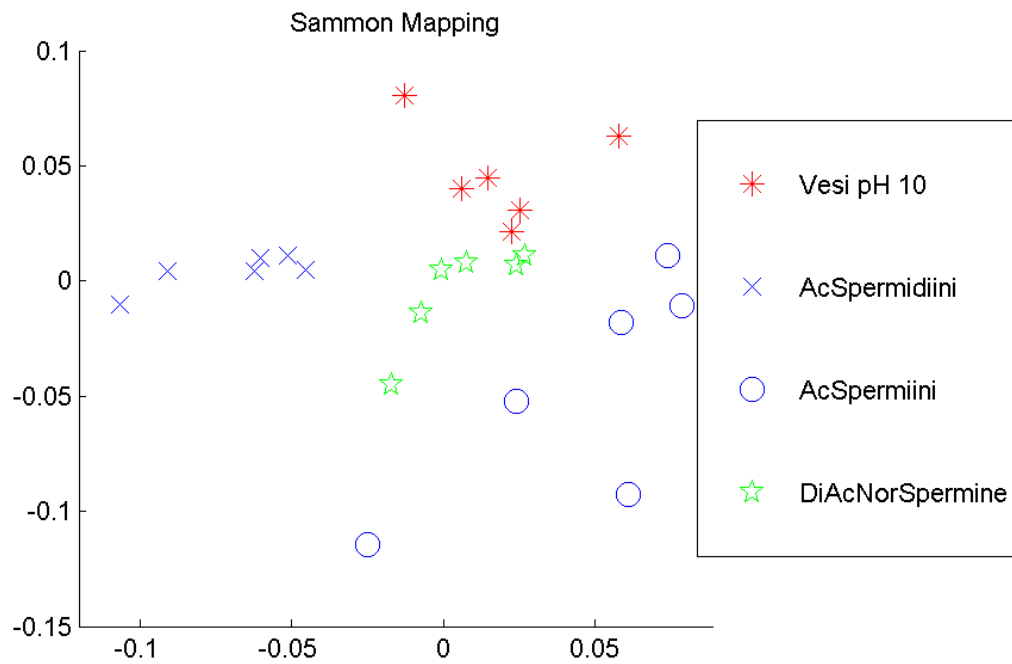
### pH10



Kuvaaja 2 pH:ssa 10 myös spermiini ja vesi erottuvat omiksi pisteparvikseen. Tässä kuvaajassa jokainen aine on erotettavissa lineaarisen funktion avulla.

**pH7**

Kuvaaja 3 pH:ssa 7 asetyylipolyamiinit eivät N1,N12-diasetyylispermiiniä lukuunottamatta erotu omiksi ryhmikseen.

**pH10**

Kuvaaja 4 pH:ssa 10 asetyylipolyamiinitkin voidaan erottaa lineaaristen funktioiden avulla sekä vedestä että toisistaan.

## 4 POHDINTA

Tutkimuksemme tärkeimpänä havaintona voidaan pitää sitä, että korkeammassa pH:ssa ChemPro 100 erotti kaikki polyamiinit paremmin vedestä. Sekä asetyloimattomat että asetyloidut polyamiinit erottuivat 100% oikein.

Dimensioreduktion osalta multidimensional scaling (MDS) antoi odotetusti primaarikomponenttianalyysiä (PCA) paremmat tulokset. MDS:n yhteydessä projektion määrittelevät vektorit haetaan matemaattisesti erotuskyvyn optimoimiseksi, kun PCA:ssa vektorit puolestaan valitaan datan valmiiden ulottuvuuksien joukosta.

pH:n noston vaikutukset erottelukyvyn olivat selvät. pH:ssa 7 mitatuista polyamiineista ainoastaan spermiini tunnistetaan 100% oikein. Spermiini sekä N1,N12-diasetyylinormospermiini tunnistetaan vielä kohtuullisen tarkasti ja menetelmällä on yli 80% osumatarkkuus. Heikoimmat tulokset saatiin N1-asetyylispermiinin osalta. Se tunnistettiin useimmiten väärin. pH:ssa 10 kaikki näytteet onnistuttiin erottamaan vedestä 100% tarkkuudella sekä MDS:ää että PCA:ta käyttäen.

Asetylaatio ei itsessään näyttänyt parantavan polyamiinien detektiota. pH:ssa 7 asetyylipolyamiinit erottuivat vedestä asetyloimattomia heikommin, mutta pH:ssa 10 ryhmien välille ei syntynyt eroja. Koska malignin kudoksen polyamiinituotanto painottuu asetyloituihin muotoihin, on näytteen pH:n nostaminen tämän havainnon pohjalta kliinisesti perusteltua.

Tutkimuksessa havaitun eron voisi hypoteesimme mukaisesti selittää polyamiinien parempi haihtuvuus. Lisääntyneen volatiliteetin voidaan ajatella lisäävän mitattavien aineiden konsentraatiota kennostossa, vähentävän satunnaisvirheen vaikutusta ja teoriassa parantavan erottelukykyä. Toisaalta on otettava huomioon, että pH:n muutos vaikuttaa mahdollisesti myös ChemPro 100:n kykyyn havaita yksittäisiä molekyylejä avaruudellisen muodon ja varauksen muuttuessa. Tämän vuoksi kokonaisvaikutus eri polyamiinienkin kohdalla voi olla erilainen.

Erottelukyvyn paraneminen pH:ta nostamalla puhtaassa polyamiinilioksessa antaa toki vain viitteellistä tietoa. Tulos voi olla tyystin erilainen mitattaessa monimutkaisempia seoksia, kuten virtsaa. pH:n muutoksen vaikutus ulottuu kaikkiin liuoksen komponentteihin, jolloin merkityksettömien taustaelementtien voimistunut detektio voi peittää alleen toivotut mittaushavainnot.

Lähtökohtaisesti syöpätautiin olennaisesti liittyvän volatiilin komponentin tarkka tunnistaminen ja tähän liittyvien kasvainsolukon mekanismien tunteminen on kliiniseen käyttöön tarkoitetun menetelmän arvioinnin kannalta hyvin oleellista. Periaatteessa elektroninen nenä voi sokkona erottaa ryhmiä toisistaan sopivalla algoritmilla, mutta tällöin tuloksia sekoittavia elementtejä ei

voida arvioida. Ei tiedetä, minkä ominaisuuden suhteen laite todellisuudessa ryhmät erottelee. Seulonnassa potilasmateriaali on hyvin heterogeenistä, hajuprofiilin haettu ominaisuus (syöpä vai ei syöpää) voi peittyä taustaelementteihin (elintavat, muut sairaudet) tai potilas voi saada väärän luokittelun syöpäpopulaatioon assosioituvien sekoittavien piirteiden vuoksi.

Viimeaikaiset tutkimustulokset ovat jo osoittaneet, että elektroniset nenät erottavat onnistuneesti syöpäpotilaita terveistä verrokeista edellä mainitulla lähestymistavalla, jossa laitteiston erotuskyvyn oletetaan perustuvan haetulle ominaisuudelle ilman tarkkaa tietoa todellisesta luokitteluperusteesta. Tämä tuottaa hankaluuksia, sillä mittausvirheitä aiheuttavia elementtejä, kuten mittausolosuhteiden ja potilaan muiden ominaisuuksien vaikutusta ei voida arvioida. Toistaiseksi taustalla olevia todellisia ”syövän hajun aiheuttajia”, luokitteluun vaikuttavia haihtuvien komponenttien muutoksia on tutkittu vain vähän. Luokitteluun vaikuttavia taustatekijöitä tutkimalla menetelmää voidaan kehittää kaikissa detektion vaiheissa: vakioimalla mittausolosuhteita optimaaliseksi, muokkaamalla laitteiston tekniikkaa halutun ominaisuuden havaitsemiseksi sekä parantamalla datan analyysimenetelmiä. Kirjallisuudessa laajasti kiinnostusta herättänyt polyamiinien mahdollinen käyttö syöpäseulonnassa on hyvä lähtökohta polyamiinihypoteesin testaustelle myös keinotekoiseen haistamiseen perustuvassa diagnostiikassa.

Työmme antaa alustavia tuloksia pH:n vaikutuksen hyödyntämisestä IMS-teknologiaan perustuvassa syöpädiagnostiikassa. Tutkimustulosta voidaan pitää lähtökohtana lisätutkimuksille näytteiden esikäsittelyä koskevien menetelmien parantamiseksi. Oletuksena on, että polyamiinit voisivat toimia keinotekoisessa haistamisessa ainakin osana todellista syövän luokitteluperustetta. Polyamiinien todellista roolia IMS-teknologiaan keinotekoiseen haistamiseen perustuvassa luokittelussa biologisissa näytteissä, kuten virtsassa, ei toki vielä tiedetä. Tämän selvittämiseksi voisi tutkia, luokitteleeko ChemPro 100 terveiden verrokeiden virtsanäytteet syöpänäytteiksi jos virtsanäytteisiin lisätään synteettisiä polyamiineja. Lisäksi pH:n muutosten vaikutusta suoraan potilas- ja verrokinäytteiden luokitteluun tulisi tutkia edelleen. Yksi mahdollinen tutkimuslinja olisi myös laitteiston sensoriikan kehittäminen polyamiinispesifisemmäksi, jolloin tieto toimisi omana osana syöpäprofiilin luokittelualgoritmia.

Eri pH-arvoissa suoritettujen mittausten datan yhdistämistä analyysivaiheessa voidaan pitää yhtenä mielenkiintoisena mahdollisuutena. Mittaukset tuottivat pH:sta riippuen merkittävästi erilaista dataa ja molemmilla kokeilla pH-arvoilla oli polyamiinien erottamisen suhteen omat etunsa. Tämän havainnon hyödyntäminen menetelmän herkkyyden ja tarkkuuden parantamiseksi sekä varsinkin polyamiinien erottamiseksi toisistaan vaatii myös osaltaan jatkotutkimuksia.

## 5 LÄHDELUETTELO

Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, Pinna C, Roncaglia R, Boraldi F, Tiozzo R, Sharrard M, Corti A. Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS letters*. 1999 446(1), pp.18–22.

Byun JA, Choi MH, Moon MH, Kong G, Chul Chung B. Serum polyamines in pre- and post-operative patients with breast cancer corrected by menopausal status. *Cancer Lett.* 2009 Jan 273(2), pp.300-4.

Casero RA, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nature reviews. Drug discovery*. 2007 6(5), pp.373–90.

Casero RA, Pegg AE. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism. *The FASEB journal*. 1993 pp.653–661.

Childs, a C., Mehta, D.J. & Gerner, E.W. Polyamine-dependent gene expression. *CMLS*. 2003 60(7): pp.1394–406.

Church J, Williams H. Another sniffer dog for the clinic? *Lancet* 2001 Sep 15;358(9285):930

Cohen SS. *A Guide to Polyamines*. Oxford University Press, New York, NY. 1998

Cornu J-N, Cancel-Tassin G, Ondet V, Girardet C, Cussenot O. Olfactory detection of Prostate Cancer by dogs sniffing urine: A step forward in early diagnosis. *Europ Urol* 2010; 59:197-201

D'Amico A, Pennazza G, Santonico M, Martinelli E, Roscioni C, Galluccio G, Paolesse R, Di Natale C. An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer. *Lung Cancer*. 2010 May;68(2):170-6.

Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, Paolesse R, D'Arcangelo G, Roscioni C, Finazzi-Agrò A, D'Amico A. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron*. 2003 Sep;18(10):1209-18.

Dragonieri S, Annema JT, Schot R, Van der Schee MP, Spanevello A, Carratù P, Resta O, Rabe KF, Sterk PJ. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer* 2009 May;64(2):166-70.

Dunzendorfer U, Russell DH. Altered polyamine profiles in prostatic hyperplasia and in kidney tumors. *Cancer Res*. 1978 Aug;38(8):2321-4.

Enjoji M, Nakamuta M, Arimura E, Morizono S, Kuniyoshi M, Fukushima M, Kotoh K, Nawata H. Clinical significance of urinary N1,N12-diacetylspermine levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Markers* 2004 Oct-Dec;19(4):322-7.

Gerner EW, Meyskens FL Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):781-92.

Hiramatsu K, Miura H, Kamei S, Iwasaki K, Kawakita M. Development of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system that can replace HPLC analysis for the determination of N1,N12-diacetylspermine in human urine. *J Biochem* 1998 Jul;124(1):231-6.

Hiramatsu K, Takahashi K, Yamaguchi T, Matsumoto H, Miyamoto H, Tanaka S, Tanaka C, Tamamori Y, Imajo M, Kawaguchi M, Toi M, Mori T, Kawakita M. N(1),N(12)-Diacetylspermine as a sensitive and specific novel marker for early- and late-stage colorectal and breast cancers. *Clin Cancer Res* 2005 Apr 15;11(8):2986-90.

Igarashi, K. & Kashiwagi, K. Modulation of cellular function by polyamines. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010 42(1), pp.39–51.

Inoue H, Fukunaga K, Munemura S, Tsuruta Y. Simultaneous determination of free and N-acetylated polyamines in urine by semimicro high-performance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent. *Anal Biochem* 2005 Apr 15;339(2):191-7.

Johnson LR, McCormack, SA. Healing of Gastrointestinal Mucosa: Involvement of Polyamines. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. 1999 14(8), pp.12–17.

Leahy M. Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: cause or association? *Bmj* 2004; 329: 1286.

Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, Burch T, Zheng S, Mazzone PJ, Mekhail T, Jennings C, Stoller JK, Pyle J, Duncan J, Dweik RA, Erzurum SC. Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 Jun 1;171(11):1286-91.

Matsumura K, Opiekun M, Oka H, Vachani A, Albelda SM, Yamazaki K, Beauchamp GK. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer: a proof of principle study using odor signatures in mouse models of lung cancer. *PloS one*. 2010 5(1), p.e8819. doi:10.1371/journal.pone.0008819

- McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K, Janecki T. Diagnostic Accuracy of Canine Scent Detection in Early- and Late-Stage Lung and Breast Cancers, *Integr Cancer Ther* 2006; 5: 30
- Pavlou A.K, Turner A.P.F. Sniffing out the Truth: Clinical Diagnosis Using the Electronic Nose, *Clinical Chem lab Med* 2000; 38(2): 99-112
- Pegg, A.E. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB life*. 2009 61(9): pp.880–94.
- Penning LC, Schipper RG, Vercammen D, Verhofstad AA, Denecker T, Beyaert R, Vandenabeele P. Sensitization of tnf-induced apoptosis with polyamine synthesis inhibitors in different human and murine tumour cell lines. *Cytokine*. 1998 10(6), pp.423–31.
- Persaud K, Dodd G. Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *Nature*. 1982 Sep 23;299(5881):352-5
- Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR, Gagliardi AJ, Gleeson K, Greenberg J, Maxfield RA, Rom WN. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest* 2003 Jun;123(6):2115-23.
- Roine A, Tolvanen M, Sipiläinen M, Kumpulainen P, Helenius MA, Lehtimäki T, Vepsäläinen J, Keinänen TA, Häkkinen MR, Koskimäki J, Veskimäe E, Tuokko A, Visakorpi T, Tammela TL, Sioris T, Paavonen T, Lekkala J, Helle H, Oksala NK. Detection of smell print differences between nonmalignant and malignant prostate cells with an electronic nose. *Future Oncol*. 2012 Sep;8(9):1157-65.
- Russell DH, Snyder SH. Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968 Aug;60(4):1420-7.
- Russell DH, Levy CC, Schimpff SC, Hawk IA. Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res*. 1971 Nov;31(11):1555-8.
- Röck F, Barsan N, Weimar U. Electronic nose: current status and future trends. *Chem Rev*. 2008 Feb;108(2):705-25. Epub 2008 Jan 19
- Tantini B, Pignatti C, Fattori M, Fiumana E, Facchini A, Stefanelli C, Caldarera CM, Pegg AE, Flamigni F. Polyamine depletion inhibits etoposide-induced NF-kappaB activation in transformed mouse fibroblasts. *Amino acids*. 2004 27(2), pp.207–14.
- Turner AP, Magan N. Electronic noses and disease diagnostics. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):161-6.



van den Berg GA, Muskiet FA, Kingma AW, van der Slik W, Halie MR. Simultaneous gaschromatographic determination of free and acetyl-conjugated polyamines in urine. Clin Chem. 1986 Oct;32(10):1930-7.

Williams H, Pembroke A. Sniffer dogs in the melanoma clinic? Lancet 1989;1:734

Willis CM, Church SM, Guest CM, Cook WA, McCarthy N, Bransbury AJ, Church MR, Church JC. Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. Bmj 2004 Sep 25; 329: 712.

Yamaguchi K, Nakamura M, Shirahane K, Konomi H, Torata N, Hamasaki N, Kawakita M, Tanaka M. Urine diacetylspermine as a novel tumour marker for pancreatobiliary carcinomas. Dig Liver Dis 2005 Mar;37(3):190-4. Epub 2004 Dec 15.